

Trabajo Fin De Máster

**Impacto del *biochar* de lodo por la fitotoxicidad de *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate**



**Estrella Muñoz García**

**Curso 2018/2019**

**Directora del proyecto: Prof. Dr. Heike Knicker**

**Codirectora del proyecto: Dr. Ana Zelia Miller**

**Tutor académico: Prof. Dr. M<sup>a</sup> Elena Fernandez Boy**

## Índice

<b>1. RESUMEN</b>	<b>4</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	<b>4</b>
2.1. <i>Materiales pirolizados como sustitutos de turba</i>	<b>4</b>
2.2. <i>Materiales pirolizados y Fusarium oxysporum</i>	<b>5</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>6</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>7</b>
4.1. <i>Material del sustrato</i>	<b>7</b>
4.1.1. <i>Pyrochars</i>	<b>7</b>
4.1.2. <i>Turba</i>	<b>7</b>
4.1.3. <i>Suelo</i>	<b>7</b>
4.2. <i>Determinación de la capacidad de retención hídrica (CRA)</i>	<b>8</b>
4.3. <i>Cultivo del hongo Fusarium oxysporum</i>	<b>8</b>
4.4. <i>Plantas de tomate</i>	<b>9</b>
4.5. <i>Diseño del experimento</i>	<b>9</b>
4.5.1. <i>Composición de las macetas</i>	<b>9</b>
4.5.2. <i>Inoculación de Fusarium oxysporum</i>	<b>10</b>
4.5.3. <i>Germinación de las semillas de Solanum lycopersicum</i>	<b>11</b>
4.5.4. <i>Peso seco</i>	<b>12</b>
4.5.5. <i>Análisis estadístico</i>	<b>12</b>
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>12</b>
5.1. <i>Capacidad de retención hídrica (CRA)</i>	<b>12</b>
5.2. <i>Agua añadida a las muestras durante todo el experimento</i>	<b>13</b>
5.3. <i>Germinación</i>	<b>15</b>
5.4. <i>Plantas que sobrevivieron</i>	<b>16</b>
5.5. <i>Altura de la planta</i>	<b>16</b>

5.6. <i>Peso seco de la parte aérea de la planta</i> .....	19
<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	20
6.1. <i>Germinación</i> .....	20
6.2. <i>Plantas que sobrevivieron</i> .....	21
6.3. <i>Altura de la planta</i> .....	21
6.4. <i>Peso seco de la parte aérea de la planta</i> .....	21
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	22
<b>8. AGRADECIMIENTOS</b> .....	22
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	22

## 1. RESUMEN

La turba es un sustrato muy utilizado en agricultura, aunque es un recurso limitante debido al agotamiento de sus fuentes naturales (turberas). Como alternativa, se recomendó el uso de *pyrochar* de lodo de depuradora, aunque estudios anteriores han demostrado que *Fusarium oxysporum*, un patógeno vegetal, está involucrado en la degradación bioquímica de este tipo de *biochar*. Por ello, en este trabajo se han realizado una serie de mediciones para comprobar el efecto del *pyrochar* de lodo de depuradora y del de poda en el impacto que tiene *F. oxysporum* en plantas de tomate y, a su vez, averiguar si el *pyrochar* de lodo puede suponer una alternativa factible a la turba en los sistemas de cultivo agrícola. Tras analizar varios parámetros, como pueden ser la capacidad de retención hídrica (CRA), el agua acumulada perdida por el sustrato, la germinación y supervivencia de las plantas y, por último, la altura y peso seco de éstas, se ha podido observar que el *pyrochar* de lodo no tiene un impacto negativo en la salud de las plantas tanto con y sin inóculo de *F. oxysporum*. Por otro lado, el *pyrochar* producido a partir de podas redujo fuertemente la supervivencia de las plantas. Esto podría indicar que el *pyrochar* de lodo puede ser un buen sustituto de la turba y que además parece ofrecer una protección a la planta contra este hongo. En el análisis estadístico no aparecen diferencias significativas entre el efecto de la turba y el *pyrochar* en el desarrollo de las plantas. Sin embargo, para confirmar estos resultados sería necesario realizar otros experimentos con diferentes parámetros basados en los resultados obtenidos en este trabajo.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. Materiales pirolizados como sustitutos de turba

La turba sigue siendo el sustrato más importante, y normalmente, el único ingrediente de las formulaciones para medios de crecimiento en la horticultura (Steiner et al., 2014). Es así porque las turberas son humedales con una capa orgánica gruesa formada por materiales vegetales en descomposición, lo que proporciona gran biodiversidad, regulación de la calidad del agua local y almacenamiento de carbono (Kern et al., 2017). Pero la extracción de la turba está siendo insostenible y está dañando a los ecosistemas de las turberas, como ha ocurrido en Europa Central y del Sur donde han desaparecido en gran medida (Kern et al., 2017). Además, en Alemania, los Países Bajos, Italia, y España, entre otros países dependen del suministro ofrecido de turba de las zonas del Norte, como los Estados Bálticos, ya que estos aún tienen reservorios de turberas (Kern et al., 2017). Es por ello que en los últimos años, se han desarrollado algunas alternativas para intentar reemplazar a la turba en los medios de cultivos. Algunos de ellos pueden ser la corteza de pino o residuos compostados (Guerrero et al., 2002). Y desde hace poco tiempo se han propuesto también materiales provenientes de la pirólisis de residuos orgánicos conocidos como *biochars*.

Un tipo de *biochar* es el de lodo de las aguas residuales que es un desecho de materia orgánica que se produce en las Plantas de Tratamiento de Agua Residual (WTP) y de Aguas Residuales (EDAR) (Gonzaga et al., 2018). La eliminación de este residuo

se ha convertido en un desafío importante porque la cantidad que se produce aumenta proporcionalmente a la población. Hay varias opciones disponibles para su eliminación, como podría ser la incineración, los rellenos sanitarios y la aplicación como enmienda de suelos. La aplicación de éstos en la agricultura es una estrategia prometedora debido a su alta concentración de nutrientes de plantas y materia orgánica (Gonzaga et al., 2018). Sin embargo, es un residuo problemático ya que puede contener patógenos, metales pesados y compuestos tóxicos (Monteiro et al., 2017). Ambos ponen en riesgo al medio ambiente y la salud humana. Para evitar este peligro, se pueden aplicar tecnologías para reducir la concentración de dichos metales e higienización mediante tratamiento térmico para la eliminación de bacterias patógenas (Monteiro et al., 2017). Recientemente se ha considerado la estabilización e higienización de lodos por medio de la carbonización termoquímica a temperaturas elevadas en ausencia de oxígeno (pirólisis). Si esta se realiza en presencia de agua, se denomina carbonización hidrotérmica, en cambio, si se realiza en ausencia de agua, se conoce como pirólisis seca, donde se utilizan temperaturas entre 300 y 700 °C.

Para que el producto sólido obtenido se denomine *biochar*, debe contener un alto contenido en carbono de acuerdo con la European Biochar Foundation. Para llamarlo *biochar* su contenido de carbono orgánico debería ser por encima del 50% y su relación atómica H / C ser inferior a 0,7 (EBC, 2019).

El producto obtenido en este estudio se denomina *pyrochar* porque no alcanza el contenido de C suficiente para ser considerado *biochar*.

Actualmente, se está investigando la fabricación de *biochars* como una nueva técnica de reciclaje que permite la transformación de diversos materiales de desecho en la naturaleza ricos en carbono, como los residuos de poda de árboles, tallos de maíz, estiércol de pollo y la fracción orgánica de los desechos sólidos urbanos (Taskin et al., 2019) en materiales que pueden tener una aplicación agrícola.

El *biochar* de poda puede fabricarse con diferentes técnicas. Uno de los métodos por los que se crea es mediante microgasificación pirolítica a una temperatura de 550°C durante 3 horas, seguido de un enfriamiento en seco (Loffredo et al., 2019).

Algunos tipos de *biochar* pueden contener compuestos orgánicos volátiles adsorbidos e hidrocarburos aromáticos policíclicos (Taskin et al., 2019).

En trabajos anteriores se ha usado el *pyrochar* de lodo para ver sus efectos en plantas y se pudo observar que al final de un experimento de 2 meses, las hojas sufrían una clorosis y no disponían de buena salud (García, 2018).

## 2.2. Materiales pirolizados y *Fusarium oxysporum*

En estudios realizados por De La Rosa et al., 2018, se supo que *Fusarium oxysporum* no sólo está colonizando el sistema de poros del *pyrochar*, sino que también está involucrado en la degradación de su red aromática. Así se demuestra que el *pyrochar*, además de estimular la degradación microbiana de la materia orgánica del

suelo, también puede ser atacado y descompuesto por microorganismos (De La Rosa et al., 2018).

*Fusarium oxysporum* es patógeno de plantas, este hongo es transmitido por el suelo y a través del tejido vascular, produciendo el marchitamiento de la planta y reduciendo su rendimiento en invernaderos (Abbasi et al., 2019). Una de sus principales características es que es casi imposible de eliminar una vez establecido y puede sobrevivir en el suelo hasta 20 años (Xue et al., 2019). El agente causal del marchitamiento por *Fusarium* en el tomate es *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Abbasi et al., 2019), que se encuentra entre los hongos fitopatógenos más importantes y diversos debido a su especificidad y virulencia. Además, su variabilidad también es debida a la presencia de razas fisiológicas numeradas de la una a la tres (R1, R2 y R3) (Vega-Gutiérrez et al., 2019). En el caso de este estudio, realizado en plantas de tomate, la raza 3 es la que les afecta, causando síntomas tales como color amarillento de las hojas inferiores, necrosis vascular, epinastia, defoliación, retraso del crecimiento de la planta y por último, la muerte (Abbasi et al., 2019).

Por lo tanto, si la adición de *pyrochar* de lodo de aguas residuales al sustrato de agricultura conduce a un aumento de *F. oxysporum* y este aumento afecta a la salud de las plantas respectivas, el *biochar* y los aditivos comparables pueden no ser utilizables como sustitutos de la turba en los suelos agrícolas.

Para probar si existe este peligro, se realizó un experimento en el que las plantas de tomate se cultivaron en mezclas de sustrato de turba y *pyrochar* de lodo o poda con y sin inoculación con *F. oxysporum*. Durante un mes y medio en el experimento se controló el crecimiento y la salud de las plantas sembradas. Como material vegetal se utilizó el tomate (*Solanum lycopersicum*), que se ha cultivado y consumido ampliamente en el mundo durante siglos. Los cultivos son susceptibles a una serie de ataques de plagas de insectos o patógenos desde el momento en que la planta emerge por primera vez de la semilla hasta su cosecha (Arjune et al., 2019). Por ello es importante conocer cómo puede afectar dicho hongo a este tipo de cultivos.

### 3. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es estudiar cómo la presencia del hongo *Fusarium oxysporum* en distintos sustratos afecta a la germinación de semillas de *Solanum lycopersicum* y a las características morfológicas de las plantas.

También, se evaluó el impacto de la incorporación de dos tipos de *pyrochars* al suelo y turba frente al crecimiento del hongo y de las plantas.

## 4. MATERIALES Y MÉTODO

### 4.1. Material del sustrato

#### 4.1.1. Pyrochars

Se utilizará un lodo de depuradora, el cual, es un residuo orgánico procedente de las aguas residuales urbanas de la zona de Huelva, concretamente de la empresa GLOBAL OMNIUM MEDIOAMBIENTE S.A. (EDAR de Punta Umbría).

El *pyrochar* de lodo que se ha utilizado ha sido preparado previamente al inicio de este trabajo mediante un proceso de pirólisis a una temperatura de 500°C durante 3 horas en un horno de Mufla utilizando un reactor fabricado para este fin.

Según el certificado europeo de biochars, el contenido en carbono del producto tiene que ser superior al 50% para poder ser llamado *biochar* (EBC, 2019). El producto de la pirólisis del lodo de depuradora utilizado tiene un porcentaje de C menor del 50% por lo que se denominará *pyrochar* de lodo.

También se usó el *biochar* de poda de árboles (ramas, cortezas, etc) que proviene de la compañía AGRI-BIO-ECO, Laboratori Riuniti S.R.L. (Italia).

Las principales características de los productos usados en este estudio se muestran en la Tabla 1.

#### 4.1.2. Turba

La turba que se utilizó es un sustrato comercial de la marca Flora-Gard, procedente de Oldenburg, Alemania, cuyo nombre es Floradur (Tabla 1).

#### 4.1.3. Suelo: Dystric Leptosol

El suelo utilizado es material del horizonte superficial de un Dystric Leptosol proveniente del Aljarafe, Sevilla (España). Los Leptosoles son suelos muy poco profundos desarrollados sobre rocas continuas y con frecuencia son suelos poco o nada atractivos para cultivos; presentando una potencialidad limitada para cultivos arbóreos o para pastos (IUSS Working Group WRB, 2007).

Este suelo se tomó a una profundidad de 0 a 15 centímetros. Presenta una textura arenosa- franca con un 16,3% de arena fina, 62,1% de arena gruesa, un 13,7% de limo y un 7,8% de arcilla. Las características químicas y físicas que se muestran en la Tabla 1, se han obtenido del Servicio General de Análisis del IRNAS (CSIC), del estudio realizado por García, et al. (2018) y en colaboración con el investigador Marcos Nocentini (Università degli studi di Firenze).

**Tabla 1.** Principales parámetros químicos de los productos utilizados como sustratos para la germinación y crecimiento de las plantas de tomate.

<i>Material</i>	<i>pH</i>	<i>Carbono</i> <i>g·kg<sup>-1</sup></i>	<i>Nitrógeno</i> <i>g·kg<sup>-1</sup></i>	<i>Hidrógeno</i> <i>g·kg<sup>-1</sup></i>	<i>Fósforo Olsen</i> <i>g·kg<sup>-1</sup></i>
<i>Pyrochar de Lodo</i>	6,4	299	44,3	13,2	-
<i>Biochar de Poda</i>	-	705	0,9	9,3	0,105
<i>Turba</i>	6,2	444	9,1	48,5	-
<i>Suelo</i>	6,1	7	0,4	-	<0,001

#### 4.2. Determinación de la capacidad de retención hídrica (CRA)

La capacidad de retención hídrica (CRA) se determina para saber aproximadamente la cantidad de agua que un sustrato puede retener y ponerla a disposición de la planta para que esta pueda usarla cuando lo requiera. La CRA es una propiedad que indica la cantidad de agua que puede retener un sustrato tras su saturación una vez eliminada el agua gravitacional de flujo rápido. La determinación consiste en analizar la diferencia de masa entre una muestra seca y la misma en el estado hídrico de retención (Paneque et al., 2016.).

Para su determinación se mide el peso total de un conjunto formado por filtros secos de la marca DORSAN (tamaño de poro 2 µm y diámetro de 125 mm), colocados en embudos y sobre matraces Erlenmeyer. A continuación, se pesa 2 gramos de muestra seca que se añade sobre los filtros previamente tarados. Se añade 20 ml de agua ultra pura (ELIX) para mojar bien todo el material. Posteriormente, se dejan drenar durante dos horas con el fin de eliminar el exceso de agua y llegar al estado hídrico de capacidad de retención. Una vez pasado este tiempo se vuelve a tomar medida del peso. Después de calcular el valor de la masa del agua retenida por la muestra a capacidad de retención se aplica la siguiente fórmula para obtener la CRA:

$$\%CRA = \frac{\text{masa de agua retenida a capacidad de retención}}{\text{masa muestra inicial seca}} \times 100$$

Para evitar el error del agua que pueda retener el filtro, se realiza el mismo proceso pero sin muestra, y se calcula el valor de la capacidad de retención hídrica, la cual se restará a los resultados obtenidos.

#### 4.3. Cultivo del hongo *Fusarium oxysporum*

Para la inoculación de los sustratos se usó el hongo *Fusarium oxysporum* B3-S3 conservado a -80°C en Glicerol al 20%.



Primero, se realizó el medio de cultivo adecuado para el crecimiento de hongos, en este caso se utilizó “Potato dextrose agar” (PDA) (Marra et al., 2018). Para su elaboración se tomó un frasco de laboratorio de vidrio borosilicato de 1000 ml al que se añadió 800 ml de agua y 31,2 gramos de PDA (comercial) y se puso en la autoclave. Se autoclavó a 120°C durante 20 minutos para tener un medio estéril. Una vez preparado el medio estéril, se procedió a llenar las placas de petri para su posterior uso. Se utilizó una campana de flujo laminar vertical donde se realizó este proceso y los descritos a continuación, para así poder seguir manteniendo la esterilidad en todo el proceso.

A continuación, se procedió a la reactivación del hongo. Para ello se sembró 50 µl de *F. oxysporum* en tres placas de petri con PDA. Además, se sembró 50 µl del hongo en 3 placas de petri con PDA y se distribuyó por toda la placa con un asa estéril.

Las placas se inocularon durante 6 días a 22°C ± 2°C. Al fin de ese período, se observó crecimiento y se hizo una resiembra a nuevas placas.

Con un asa estéril se cortó un cuadrado de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> del medio de cultivo con hongo crecido y se transfirió a una nueva placa (boca abajo para que esté en contacto con el PDA).

Se volvió a incubar 6 días a 22°C ± 2°C, terminando el proceso y dejando el cultivo listo para su inoculación en las muestras.

#### 4.4. Plantas de tomate

Para este experimento se usaron plantas de tomate de la especie *Solanum lycopersicum*, la variedad Moneymaker. Se tomaron semillas comerciales de la marca Gartenland, donde se indica que esta variedad tiene una germinación entre 8 a 14 días. Además, es de alto rendimiento y es adecuada para un cultivo tanto al aire libre como bajo protección.

#### 4.5. Diseño del experimento

##### 4.5.1. Composición de las macetas

Se tomaron un total de 54 macetas de plástico en las que se añadieron diferentes mezclas de sustrato o tratamientos, estas mezclas se hicieron por duplicado. La mitad corresponden a los controles, es decir, las mezclas de suelo/turba/biochar/pyrochar sin el hongo *Fusarium oxysporum* y la otra mitad a las mezclas inoculadas con *F. oxysporum*. Para cada tratamiento se realizaron tres réplicas.

Para obtener un tamaño de partícula adecuado, antes de realizar las mezclas se molieron en un mortero para que quedase lo más fino posible. Por otro lado, en el caso del suelo se tamizó con un tamiz de luz de 2 mm.

Posteriormente, se procedió a crear las mezclas (Tabla 2) en los tubos de Falcon de 50 ml.

En la tabla 2 se muestran los porcentajes, en volumen, de los distintos sustratos en cada uno de los tratamientos estudiados.

**Tabla 2.** Composición en porcentaje volumétrico de los tratamientos estudiados y nomenclatura que se utilizará durante el ensayo.

<i>Muestras</i>	<i>Pyrochar de lodo al 100%</i>	<i>Turba al 40%</i>	<i>Suelo al 40%</i>	<i>Biochar de Poda al 100%</i>	<i>Turba al 100%</i>	<i>Suelo al 100%</i>
<i>Pyrochar de Lodo al 100%</i>	LO100%					
<i>Pyrochar de Lodo al 60%</i>		LO60/TU 40%	LO60/SU 40%			
<i>Biochar de Poda al 100%</i>				PO100%		
<i>Biochar de Poda al 60%</i>		PO60/TU 40%	PO60/SU 40%			
<i>Turba al 100%</i>					TU100%	
<i>Turba al 60%</i>			TU60/SU 40%			
<i>Suelo al 100%</i>						SU100%

Primero, se hizo el 100% de volumen para cada tipo de sustrato. A continuación, se realizaron cuatro mezclas con diferentes volúmenes, donde el 60% se corresponde al *pyrochar* de lodo o biochar de poda respectivamente y el 40% a la turba o al suelo según el caso. Y por último, también se hizo una mezcla entre la turba y suelo, donde en este caso el 60% del volumen se corresponde a la turba.

Para mantener el porcentaje de humedad al 50% de la CRA se pesaron las macetas cada 2 o 3 días en una balanza y se le añadió el agua necesaria para contrarrestar las pérdidas de humedad sufridas por evaporación.

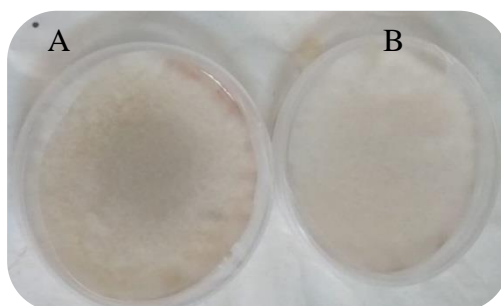
#### 4.5.2. Inoculación de *Fusarium oxysporum*

Al final de la incubación del hongo en los medios de cultivo se realizó un conteo de conidios para la preparación del inóculo con una concentración de  $10^5$  conidios/ml (Katan et al., 1997). Este proceso se realizó en una campana de flujo laminar vertical para mantener la esterilidad de todos los materiales que se usaron. A cada placa se le añadió 10 ml de agua estéril y se raspó la placa suavemente con un asa (Yogev et al., 2006) (Figura 1). A continuación, se filtró este contenido a un vaso de precipitado de cristal con papel de filtro de 2  $\mu$ m y diámetro de 125 mm. Una vez filtrada la muestra de agua con conidios se procedió al conteo de los mismos mediante una cámara de Neubauer chamber. Esta cámara tiene un área de 0,0025 mm<sup>2</sup> en los cuadrados más pequeños, por lo tanto cada cuadrado principal tiene un área de 0,04 mm<sup>2</sup> (0,0025 x 16=0,04). Y la profundidad de la cámara es de 0,100 mm.

Se añadió en la cámara 10 µl de la suspensión de conidios y se observaron en un microscopio óptico (OLYMPUS modelo BX40), primero a 4X y cuando se procedió al conteo en 10X. Se contaron cuatro cuadrados y luego se realizó una media de los conidios.

Tras aplicar el factor de dilución correspondiente para obtener el valor de  $10^5$  conidios/ml, se inoculó cada maceta con 1 ml de la suspensión de conidios.

Se dejó crecer el hongo durante tres días antes de proceder a la germinación de las semillas de tomate.



**Figura 1.** Fotografía de las placas de petri con *Fusarium oxysporum*. A corresponde al hongo más viejo empezando a tener un aspecto más pardo, y B es un hongo más joven con el micelio blanco.

#### 4.5.3. Germinación de las semillas de *Solanum lycopersicum*

Una vez pasados tres días se plantaron en cada maceta cinco semillas de tomate para observar así su porcentaje de germinación, tanto en las macetas con *F. oxysporum* como sin el hongo. Las macetas se mantuvieron en el invernadero en condiciones controladas de 25°C y 14 horas de luz durante 43 días. La germinación se monitorizó cada 2 o 3 días. Cuando se observó que empezaron a germinar más semillas se procedió a dejar sólo una planta por maceta y el resto se eliminaron (Figura 2).



**Figura 2.** Fotografía de los 54 tratamientos cuando ya habían germinado algunas de sus semillas de tomate a los 3 días de la siembra.

Cuando las plantas empezaron a tener un tamaño aproximadamente de unos 3 centímetros se tomó medidas de los tallos y se analizó la afección del hongo. La medición se realizó con ayuda de una regla midiendo desde la base del sustrato hasta el primer nudo (Figura 3).



**Figura 3.** Fotografía que indica desde que puntos fue tomada la medición de la altura.

#### 4.5.4. Peso seco

Pasado un mes y medio se retiraron las plantas de los sustratos con ayuda de una espátula y se cortaron a nivel del nudo separando la parte aérea de la planta de sus raíces. A continuación, se pesaron en una balanza para saber el peso fresco de cada una de ellas. Luego, se metieron en un sobre con su identificación y se pusieron en la estufa a 70°C durante tres días. A continuación, se pesaron cada una de las plantas de nuevo en una balanza para así obtener el peso seco. Esto se realizó para poder ver si hay diferencias entre las plantas afectadas por *F. oxysporum* y las plantas control y si el sustrato ha causado algún efecto sobre ellas.

#### 4.5.5. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa IBM SPSS Statistics versión 20 para analizar los caracteres vegetativos y su éxito de germinación. Se estudiaron las posibles diferencias significativas entre los distintos tratamientos y su inoculación o no con *Fusarium oxysporum*. Primero se comprobó que los datos seguían una distribución normal mediante el test de Shapiro-Wilk y además, que fueran homocedásticos observando el test de Levene. A continuación, se utilizó el test ANOVA seguido del test de Tukey's-b (en el caso de datos homocedásticos) o del test T3 de Dunnett's (en el caso de datos no homocedásticos) para estudiar las diferencias entre tratamientos. Las diferencias se consideraron significativas cuando el análisis presentaba un valor de  $p < 0,05$ .

## **5. RESULTADOS**

### 5.1. Capacidad de retención hídrica (CRA)

En la Tabla 3 se muestran los valores medios y las desviaciones estándar (SD) de la capacidad de retención hídrica en los tratamientos estudiados.

En los distintos tratamientos, sin la inoculación del hongo, se observa que la mayor capacidad de retención hídrica, ( $\bar{x}=244\% \pm 17$ ), se da en el tratamiento de

PO60/TU40%, seguido por PO100% ( $\bar{x}=227\% \pm 14$ ). En ambos casos la desviación estándar es menor del 7% del valor. El siguiente tratamiento más eficaz respecto a la retención, es la TU100% ( $\bar{x}=157\% \pm 25$ ), en este caso la SD es elevada, estando en torno al 16% del valor. Sin embargo, en estudios realizados por García et al. (2018) los valores de CRA en la turba eran más elevados ( $\bar{x}=344\% \pm 35$ ). Seguidamente el de mayor retención hídrica sería el LO60/TU40% con una media de  $115\% \pm 14$ . El valor obtenido para LO100% ( $\bar{x}=99\% \pm 12$ ) es semejante al obtenido por García et al. (2018),  $\bar{x}=94\% \pm 3$ , para sustratos similares. También se puede observar, que el tratamiento con una SD más baja en nuestro experimento es el tratamiento de TU60/SU40% ( $\bar{x}=100\% \pm 7$ ), teniendo éste también una media alta comparándola con el resto de nuestros valores y muy parecida al de la mezcla de LO60/TU40% ( $\bar{x}=115\% \pm 14$ ). El resto de tratamientos tienen medias más similares entre ellos, excepto el SU100% ( $\bar{x}=58\% \pm 21$ ) que tiene la retención hídrica más baja de nuestros datos, además de una SD también más alta que el resto, siendo esta del 21.

**Tabla 3.** Valores medios y desviaciones estándar (SD) de la capacidad de retención hídrica (CRA) determinada para las mezclas utilizadas en los distintos tratamientos.

Muestras	Media CRA (%)	$\pm$ SD CRA
LO100%	99	12
LO60/TU40%	115	14
LO60/SU40%	87	17
PO100%	227	14
PO60/TU40%	244	17
PO60/SU40%	95	38
TU100%	157	25
TU60/SU40%	100	7
SU100%	58	21

## 5.2. Agua añadida a las muestras durante todo el experimento

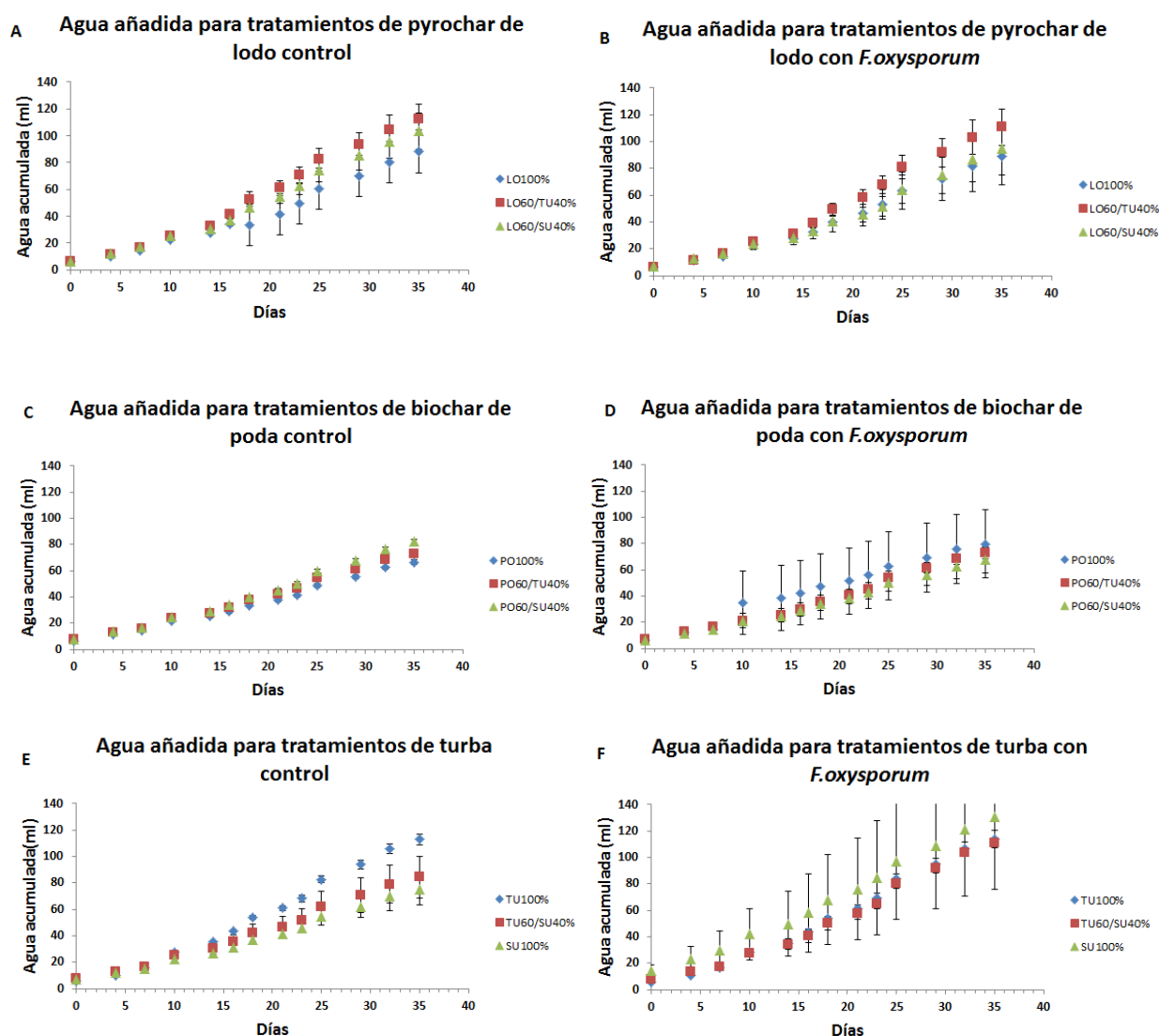
El agua añadida acumulada necesaria para mantener el contenido de humedad a lo largo del experimento se muestra en la Figura 4 en seis gráficas diferentes, comparando los tratamientos (*pyrochar*, *biochar* de poda y turba) todos con y sin hongo.

En las gráficas A y B se puede observar que el tratamiento que ha necesitado mayor aporte de agua ha sido el LO60/TU40% que se mantiene siempre por encima de los otros tratamientos, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas, no encontrándose diferencias entre inocular o no el hongo.

En cambio, en el *biochar* de poda se observa, en las gráficas C y D que, si hay más diferencias de comportamientos entre los tratamientos sin hongo y con él, ya que en el caso donde no hay inóculo el agua añadida es mayor para PO60/SU40% y en el caso donde sí hay, es mayor para la PO100%.

Por último, en la turba (gráficas E y F), también se ven datos diferentes entre los tratamientos con hongo y sin él. Para los que no poseen hongo parece que se requiere añadir mayor cantidad de agua en TU100%, alcanzando los valores más elevados. Sin embargo, cuando hay hongo el SU100% tiene un valor mayor en comparación con el resto, y la TU100% y TU60/SU40% tienen valores muy parecidos.

Se puede ver que la TU100% tanto con hongo como sin él tiene unos valores mayores de agua añadida acumulada que el resto, seguido por el LO60/TU40%. Por último, los tratamientos con *biochar* de poda son los que ha habido que añadirles menos cantidad de agua durante el experimento (Figura 4).



**Figura 4.** Medias del agua añadida a las diferentes muestras. A y B corresponden a los tratamientos con pyrochar de lodo sin y con hongo. En azul LO100%, en rojo LO60/TU40% y en verde LO60/SU40%. C y D pertenecen a los tratamientos con biochar de poda sin y con hongo. Siendo en azul PO100%, en rojo PO60/TU40% y en verde PO60/SU40%. E y F son los tratamientos con turba sin y con *F. oxysporum*. En azul la TU100%, en rojo TU60/SU40% y en verde el SU100%.

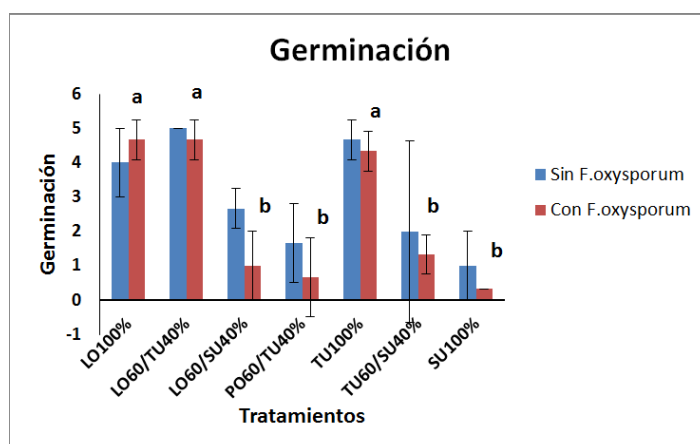
### 5.3. Germinación

La germinación de las primeras semillas comenzó a los 3 días del inicio del experimento.

Para el análisis estadístico se escogió el día de máxima germinación, siendo éste 7 días después de la germinación. Sin embargo, hay tratamientos donde las plantas mueren antes de llegar al séptimo día, por tanto, se tomaron los datos del tercer día después de su germinación, esto ocurrió en los tratamientos de PO60/TU40% con y sin inoculación del hongo y SU100% sin hongo.

Para los datos de la germinación no se analizaron los tratamientos de PO100% y PO60/SU40% porque en ninguno hubo germinación a lo largo de todo el experimento. Se analizó el resto de tratamientos, por un lado los que tenían inoculación de *F. oxysporum* y por otro, los que no tenían inoculado al hongo. En este último caso no se observan diferencias significativas entre los diferentes tratamientos.

En cambio, cuando se analizó los tratamientos con inóculo del hongo, se observó que había diferencias significativas entre ellos, creando dos grupos donde existían diferencias significativas entre ellos pero no dentro de los miembros de cada grupo. Un primer grupo donde no existía diferencias entre ellos, compuesto por: LO100% ( $\bar{x}=4,66$  semillas germinadas  $\pm 0,57$ ), LO60/TU40% ( $\bar{x}=4,66$  semillas germinadas  $\pm 0,57$ ) y TU100% ( $\bar{x}=4,33$  semillas germinadas  $\pm 0,57$ ) y un segundo grupo formado por: LO60/SU40% ( $\bar{x}=1$  semillas germinadas  $\pm 1$ ), PO60/TU40% ( $\bar{x}=0,66$  semillas germinadas  $\pm 1,15$ ), TU60/SU40% ( $\bar{x}=1,33$  semillas germinadas  $\pm 0,57$ ) y SU100% ( $\bar{x}=0,33$  semillas germinadas  $\pm 0$ ) (Figura 5). Si se comparan estos dos grupos, se observa que el primer grupo tienen una mayor germinación que el segundo. Además, se observa que los tratamientos donde hay suelo tienen una menor germinación, y estos se encuentran en este segundo grupo. También se podría decir que hay una tendencia a que los tratamientos sin inóculo con el hongo tienen una mayor germinación respecto a los que tienen *F. oxysporum*.



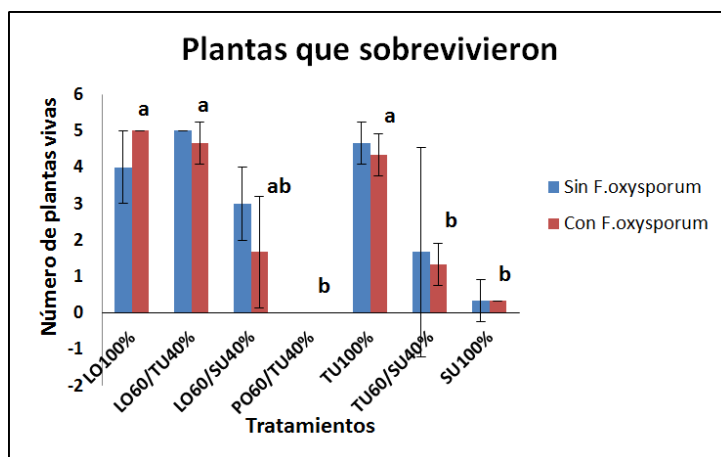
**Figura 5.** Medidas de la germinación en cada tratamiento. En azul las medias cuando no hay inóculo del hongo y en rojo cuando hay inoculación de *F. oxysporum*. Con letras se han indicado las diferencias significativas entre tratamientos cuando hay inóculo del hongo.

#### 5.4. Plantas que sobrevivieron

Para analizar la supervivencia de las plántulas se tomaron los valores medidos el día 14 después de la siembra. Nuevamente los datos de PO100% y PO60/TU40% no se tomaron en cuenta porque no hubo germinación.

Tras el análisis de los datos de los tratamientos sin hongo se vio que no había diferencias significativas entre ellos. Por el contrario, cuando se analizan los datos donde sí hay inoculación aparecen diferencias significativas entre dos grupos. Donde los tratamientos de LO100% ( $\bar{x}=5$  plantas  $\pm 0$ ), LO60/TU40% ( $\bar{x}=4,66$  plantas  $\pm 0,57$ ) y TU100% ( $\bar{x}=4,33$  plantas  $\pm 0,57$ ) forman un grupo que no tienen diferencias entre ellos pero sí con el grupo formado por: PO60/TU40% ( $\bar{x}=0$  plantas  $\pm 0$ ), TU60/SU40% ( $\bar{x}=1,33$  plantas  $\pm 0,57$ ) y SU100% ( $\bar{x}=0,33$  plantas  $\pm 0$ ). A su vez, el tratamiento de LO60/SU40% ( $\bar{x}=1,66$  plantas  $\pm 1,52$ ) no presenta diferencias significativas con ninguno (Figura 6). Si se comparan ambos grupos se observa que los del primer grupo tienen un mayor número de plantas que sobrevivieron, y nuevamente al ver los tratamientos donde hay suelo tienden a tener un menor número de plantas vivas al final del experimento. Además, se puede ver que las plantas con *biochar* de poda, en este caso PO60/TU40% no han sobrevivido ninguna en ninguno de los casos (sin y con hongo).

Por último, podríamos decir que hay una tendencia a un mayor número de plantas que sobreviven cuando no hay presencia de *F. oxysporum*, exceptuando en el caso de LO100%, esto también se pudo observar en la germinación.



**Figura 6.** Muestra las medias de las plantas que sobrevivieron en cada tratamiento. En azul las medias cuando no hay inóculo del hongo y en rojo cuando hay inoculación de *F. oxysporum*. Con letras se han indicado las diferencias significativas entre tratamientos cuando hay inóculo del hongo.

#### 5.5. Altura de la planta

El análisis de la altura de la planta se muestra en las Figuras 7 y 8. En las gráficas de la Figura 7 se muestran los tratamientos que contenían *pyrochar* de lodo con y sin hongo (control), y en la Figura 8 los tratamientos que contenían turba. En este caso, no

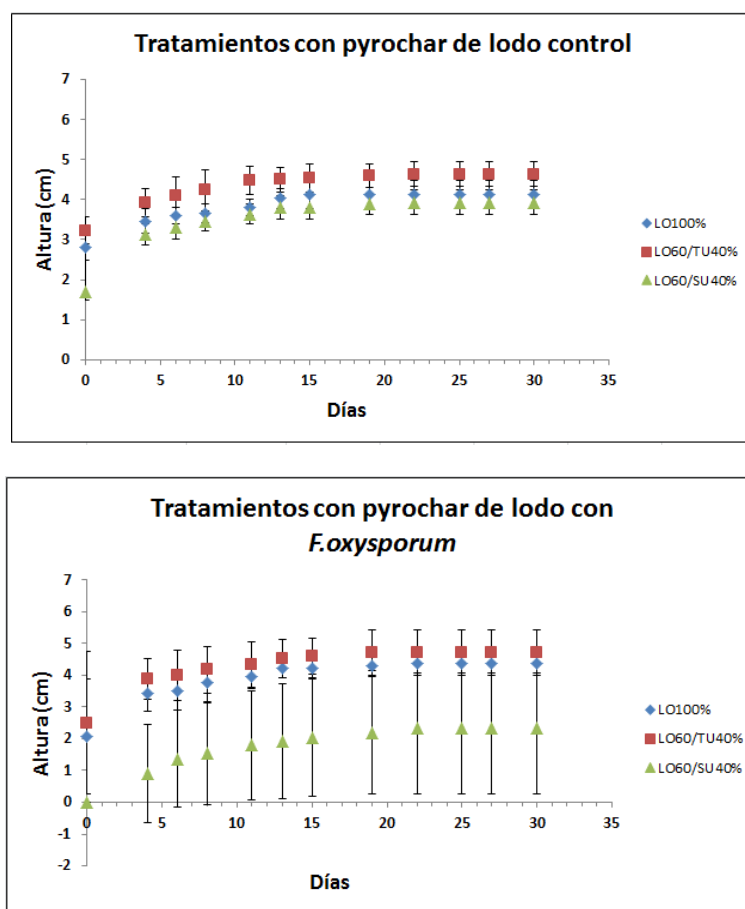


se han realizado las gráficas con los tratamientos de *biochar* de poda, porque no teníamos plantas a las cuales realizarle la medida.

Se puede observar que para las cuatro gráficas aumenta la altura de todas las plantas y que al llegar los últimos días se paraliza el crecimiento de éstas.

Observando la primera gráfica de los *pyrochars* de lodo control, se muestra que las plantas de mayor tamaño son las de LO60/TU40% (medias que van de 3,2 cm a 4,6 cm), seguidas de LO100% (medias entre 2,8 cm y 4,13 cm) y por último, y con un menor tamaño LO60/SU40% (entre 1,7 cm y 3,9 cm). Sin embargo, parece que tampoco tienen unos tamaños muy diferentes entre ellas.

En cambio, si se compara con la segunda gráfica, donde son estos mismos tratamientos pero en presencia de *F. oxysporum*, el tratamiento LO60/SU40% tiene un tamaño menor (medias en torno a 0,9 cm y 2,3 cm) comparándolo con los otros dos tratamientos con hongo e incluso comparándolo con el tratamiento control, además se ven que tienen unas barras de error muy grandes, estas barras también son debido a que en algunas de sus réplicas sus valores son 0, y por eso los datos son menos claros. En cambio, si se mira los otros dos tratamientos con hongo, si tienen un tamaño similar al de los tratamientos control (Figura 7).

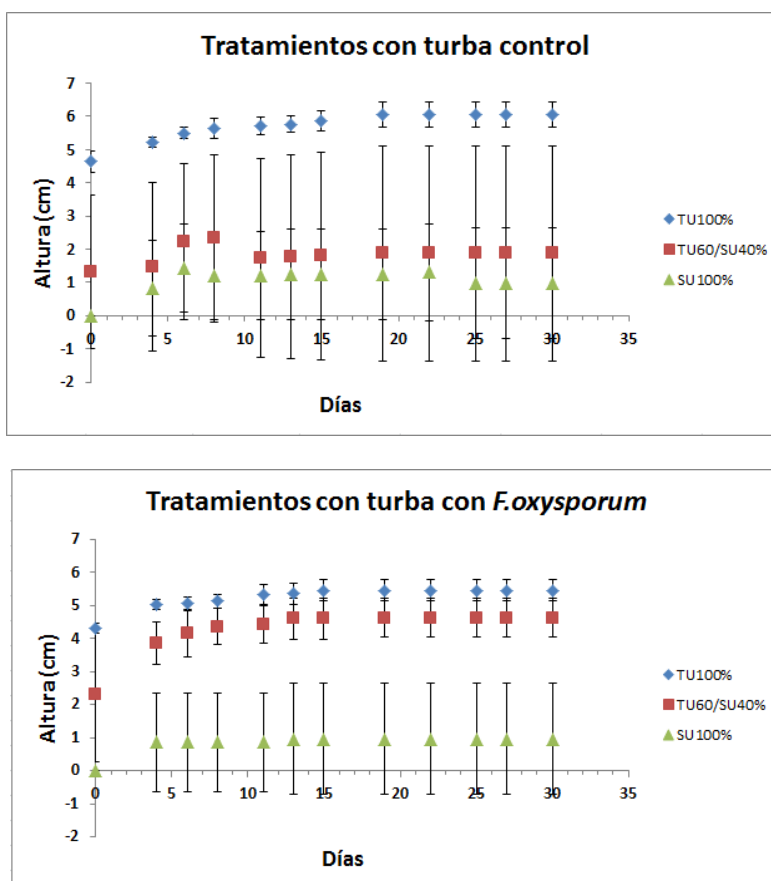


**Figura 7.** Medias de la altura de las plantas en centímetros de los tres tratamientos que contienen pyrochar de lodo. La primera gráfica hace referencia a los tratamientos sin hongo y

la segunda a los que se les inoculó *F. oxysporum*. En azul se representa el LO100%, en rojo al LO60/TU40% y en verde al LO60/SU40%.

Para finalizar se realizaron las gráficas de los tratamientos con turba si se observa la primera, el tratamiento de TU100% era la de mayor tamaño (medias entre 4,6 cm y 6,06 cm) y teniendo un error muy pequeño, en comparación con el resto. Donde se puede observar que los otros dos tratamientos tienen medias más similares entre ellos y con grandes desviaciones, siendo sus medias en torno a 1,3 cm y 1,8 cm es para TU60/SU40% y de menor tamaño que el resto el SU100% (0,83 cm y 0,97 cm).

Se observa en la segunda gráfica que se sigue manteniendo el mayor tamaño para la TU100% (medias de 4,33 cm y 5,47 cm) en presencia del hongo y esta vez le sigue la TU60/SU40% (medias entre 2,3 cm y 4,6 cm) teniendo medias más similares a ésta y ambas con desviaciones pequeñas. En cambio el SU100% sigue siendo el de menor tamaño (0,86 cm y 0,96 cm) prácticamente igual que sin presencia del hongo. Si se miran ambas gráficas se puede observar que donde existe una mayor diferencia entre presencia del hongo y sin él es en el tratamiento de TU60/SU40% (Figura 8).



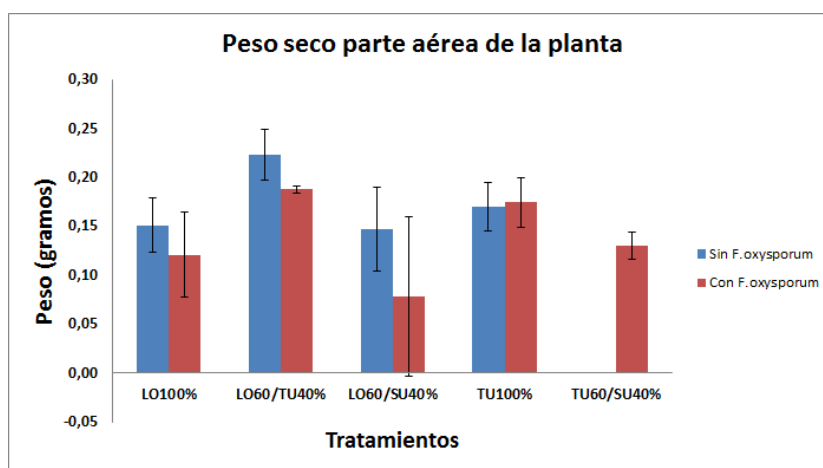
**Figura 8.** Medias del tamaño de las plantas en centímetros de los tres tratamientos que contienen turba. La primera gráfica hace referencia a los tratamientos sin hongo y la segunda a los que se les inoculó *F. oxysporum*. En azul se representa el TU100%, en rojo al TU60/SU40% y en verde al SU%.

Por último, se podría decir que el tratamiento con TU100% con o sin hongo, tiene un tamaño mayor que con el resto de tratamientos y en cambio el de menor tamaño es el SU100%. Y el valor intermedio sería el tratamiento de LO60/TU40% que también está compuesto por turba.

### 5.6. Peso seco de la parte aérea de la planta

Por último, se analizó el peso seco de la parte aérea de la planta. En este caso no se usó ningún dato de los tratamientos que contenían *biochar* de poda. Además, para el análisis estadístico sólo se usaron los datos de los tratamientos donde había tres réplicas con valores, las que contenían algún cero, ya bien porque en esa réplica no germinó o porque murió antes de finalizar el experimento, no se les realizó el análisis. En el caso de TU60/SU40% sólo hubo datos suficientes para el análisis cuando se había inoculado el hongo.

Se realizó el análisis del resto de los tratamientos entre ellos cuando había *F. oxysporum* y cuando no. Tras analizarlos se observaron que no existían diferencias significativas en ninguno de los dos casos. En el caso donde no hay inoculación del hongo parece que hay una tendencia a tener un mayor peso seco en las plantas, sobre todo en los tratamientos que se componen de *pyrochar* de lodo (siendo sus medias entre 0,22 gramos - 0,15 gramos), en comparación con los que presentan *F. oxysporum* (siendo en este caso sus medias en torno a 0,19 gramos - 0,08 gramos). En cambio, se podría ver en la gráfica que en los tratamientos con TU100% no parece que haya una diferencia en el peso cuando existe hongo ( $\bar{x}=0,17$  gramos  $\pm 0,03$ ) y sin él ( $\bar{x}=0,17$  gramos  $\pm 0,02$ ) (Figura 9).



**Figura 9.** Muestra las medias del peso seco de las plantas (sin contar la raíz) en gramos. En azul las medias cuando no hay inoculación del hongo y en rojo cuando sí hay inóculo de éste. Se muestran también las barras de error.

## 6. DISCUSIÓN

Uno de los objetivos del presente trabajo ha sido comprobar si existe diferencias morfológicas en las plantas asociadas a la afección por *F. oxysporum* y una segunda perspectiva ha sido ver si el *pyrochar* de lodo podría ser una alternativa para sustituir a la turba en los medios de cultivo (Gonzaga et al., 2018). Los resultados del agua añadida acumulada no dan unos resultados significativos para poder decir si la presencia del hongo afecta, a la necesidad de agua. En algunos tratamientos si se observa que con y sin inóculo la adición de agua cambia, pudiendo deberse a que el hongo cambie algunas condiciones del sustrato. Sin embargo, tanto para la CRA como para el agua añadida, los resultados no fueron concluyentes a la hora de comprobar los efectos con los diferentes sustratos, sólo parece que los tratamientos de PO100% y PO60/TU140% además de tener el mayor porcentaje de CRA respecto al resto, son a los que hay que añadirles menos agua. Según Laird et al. (2010) los suelos que eran modificados con *biochar* tenían una mayor retención de agua en el equilibrio drenado por gravedad (hasta un 15%) y mayor retención de agua a -1 y -5 bares del potencial matricial del agua del suelo, por esto la necesidad de añadir agua a lo largo de los días, es menor.

Unos componentes importantes que determinan la CRA son la textura del suelo y el contenido de materia orgánica. Para el agricultor aumentar la materia orgánica del suelo es una buena opción para aumentar la CRA en su granja, esto puede verse en este trabajo donde la TU100% tiene una alta CRA. En cambio, es a uno de los tratamientos a los que hay que añadirles una mayor cantidad de agua, ofreciendo unos resultados contradictorios. El aumento de CRA en el suelo supondría un ahorro de tiempo, dinero y energía a la hora de plantas en jardín, invernadero y horticultura en general (Vengadaramana et al., 2012).

Por último, el aumento de la necesidad de añadir agua puede estar relacionado con la presencia de plantas y su vigor, ya que en los tratamientos donde las plantas crecieron más y mejor, éstas demandan más agua al sustrato.

### 6.1. Germinación

El *biochar* de poda tiene una alta CRA, lo que debería ser beneficioso para la germinación y crecimiento de las plantas, en cambio en nuestro trabajo no hubo un éxito en la germinación de éstas. Esto puede ser debido a la manera de producción del material. Es posible que en las condiciones de pirólisis utilizadas se produzcan gases tóxicos y no se eliminen adecuadamente, lo que conlleva que componentes tóxicos para la planta sigan ahí y eso le afecte a su germinación.

En cambio, para los tres tratamientos con *pyrochars* de lodo no se observa que este hecho afecte a la germinación respecto a la TU100%, ya que no se encuentran diferencias estadísticamente significativas, con y sin inóculo. Estos resultados parecen indicar que este *pyrochar* podría ser una buena alternativa de sustitución de la turba,

coincidiendo con los resultados de Laird et al. (2010) que indican que las enmiendas de *biochar* tienen el potencial de mejorar la calidad y el estado de fertilidad de los suelos agrícolas.

En el caso de los tratamientos con el suelo empobrecido, con bajo contenido en carbonatos (0,6 %) y nutrientes, la germinación de las semillas ha sido muy escasa en todos los casos, especialmente cuando se inoculó el hongo. Esto puede ser debido a que la planta sufre las limitaciones de nutrientes y además, el ataque de *F. oxysporum*.

### 6.2. Plantas que sobrevivieron

Respecto a la supervivencia cuando comparamos los tratamientos con *F. oxysporum* y sin él, parece que cuando se añade *pyrochar* de lodo hay una tendencia a ayudar a la supervivencia de la planta cuando existe la presencia del hongo, se puede pensar que el *pyrochar* reduce el impacto negativo que ocasiona el hongo en la planta. Estudios anteriores (De La Rosa et al., 2018) demuestran que este hongo degrada el *pyrochar* de lodo obtenido de agua residuales, por lo que puede que esto ocasione que la planta pueda germinar bien, ya que el hongo está alimentándose de dicho *pyrochar*.

Por último, al observar los datos en la gráfica de LO60/TU40% y TU100% sin hongo, la estadística nos dio que no había diferencias entre ellos, lo que vendría a apoyar la idea de que se podría ir disminuyendo el uso de la turba y sustituirla por este *pyrochar*. No obstante, se considera necesario más experimentos para confirmarlo.

### 6.3. Altura de la planta

Comparando los tratamientos con *pyrochar* parece que la tendencia es a que no afecta el hongo al crecimiento de las plantas. De igual manera, cuando se observan los tratamientos con turba, tampoco se ve afectada la altura de la planta por la presencia del hongo.

Donde sí se observa una disminución del crecimiento en presencia del hongo es en las mezclas LO60/SU40% y TU60/SU40%, lo que indica, de nuevo, que el hongo afecta más cuando no hay *pyrochar*, además de la propia infertilidad de este suelo, por tener bajos contenidos en carbonatos.

En el estudio de Gonzaga et al. (2018) se demostró que el uso de *biochars* de lodos de depuradora mejoró el crecimiento y los rasgos morfológicos de las plántulas de eucalipto. Al igual Biederman et al. (2013) encuentran que entre los beneficios de agregar *biochars* a los suelos agrícolas está la promoción del crecimiento de las plantas y la disminución de la incidencia de enfermedades en los cultivos.

### 6.4. Peso seco de la parte aérea de la planta

Por último, al observar la gráfica entre los diferentes tratamientos con y sin hongo, no se observan grandes diferencias en el peso seco de las plantas. Aunque parece que hay una tendencia a disminuir el peso cuando existe la presencia de *F. oxysporum*,

excepto en TU100% que son prácticamente iguales. Y la estadística no arroja diferencias significativas entre los tratamientos por lo que se podría decir que el *pyrochar* de lodo tampoco tiene un efecto negativo en el peso final de la planta respecto a la turba. Esto corresponde con lo observado anteriormente en la altura de la planta.

## 7. CONCLUSIONES

El *pyrochar* de lodo se podría decir que reduce el impacto negativo que ocasiona el hongo a las plantas, ya que le ofrece un sustrato de alimento al hongo a la vez que parece que protege a las plantas de los ataques de éste. Esto se ha podido ver en los caracteres morfológicos de la planta (crecimiento y peso seco), además de en su germinación y supervivencia.

Parece ser que el *pyrochar* de lodo de depuradora estudiado podría sustituir como medio de cultivo a la turba, aunque convendría realizar estudios complementarios que confirmaran la tendencia encontrada.

## 8. AGRADECIMIENTOS

Se le agradece la ayuda al invernadero del IRNAS (CSIC) por poder hacer uso de sus instalaciones. Mostrar también mi agradecimiento a M. Nocentini, J.M. García y A. Miller, por haber ayudado en los datos químicos de las muestras de los diferentes sustratos y por el hongo *Fusarium oxysporum*. Por último, agradecer a Heike Knicker y M<sup>a</sup> Elena Fernandez Boy por su asesoramiento en el estudio realizado.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

**Abbasi, S.; Safale, N.; Sadeghi, A.; Shamsbakhsh, M.** (2019). “*Streptomyces* strains induce resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Race 3 in tomato through different molecular mechanisms”. *Frontiers in Microbiology*, 10: 1505.

**Arjune, Y.P.; Ansari, A.A; Jaikishun, S.; Homenauth, O.** (2019). “Effect of vermicompost and other fertilizers on soil microbial population and growth parameters of f-1 mongal tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.)”. *Pakistan Journal of Botany*, Vol. 51, 5: 1883-1889.

**Biederman, L.A.; Harpole, W.S.** (2013). “Biochar and its effects on plant productivity and nutrient cycling: a meta-analysis”. *GCB Bioenergy*, 5: 202–214.

**De La Rosa, J.M.; Miller, A.Z.; Knicker, H.** (2018). “Soil-borne fungi challenge the concept of long-term biochemical recalcitrance of pyrochar”. *Scientific Reports*, 8: 2896.

**European Biochar Foundation (EBF):** EBC (2012). “European Biochar Certificate - Guidelines for a Sustainable Production of Biochar”. *Arbaz, Switzerland*, <http://www.european-biochar.org/en/home>. Version 4.8 of March 2012. Visitado el 24-07-2019.

**European Biochar Foundation (EBF):** EBC (2012). “European Biochar Certificate - Guidelines for a Sustainable Production of Biochar”. *Arbaz, Switzerland*, <http://www.european-biochar.org/biochar/media/doc/ebc-guidelines.pdf>. Version 6.2 of 4<sup>th</sup> February 2016. Visitado el 02-08-2019.

**García, J.M.** (2018). “Materia orgánica carbonizada como sustituto de turba en cultivos en sustrato sin suelo”. TFG del Grado en Química defendido junio 2018. Universidad de Sevilla.

**Gonzaga, M.I.S.; Mackowiak, C.; Quintão de Almeida, A.; Tínel de Carvalho Júnior, J.I.** (2018). “Sewage sludge derived biochar and its effect on the growth and morphological traits of *Eucalyptus grandis* W.Hill ex Maiden seedlings”. *Ciência Florestal* (Santa Maria), Vol. 28, 2: 687-695.

**Guerrero, F.; Gascó, J.M.; Hernández-Apaolaza, L.** (2002). “Use of pine bark and sewage sludge compost as components of substrates for *Pinus pinea* and *Cupressus arizonica* production”. *Journal of Plant Nutrition*, 25: 129-141.

**IUSS Working Group WRB.** (2007). World Reference Base for Soil Resources, first update 2007. World Soil Resources Reports 103. Rome: FAO.

**Katan, T.; Shlevin, E.; Katan, J.** (1997). “Sporulation of *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici on Stem Surfaces of Tomato Plants and Aerial Dissemination of Inoculum”. *Phytopathology*, 87: 712-719.

**Kern, J.; Tammeorg, P.; Shanskiy, M.; Sakrabani, R.; Knicker, H.; Kammann, C.; Tuhkanen, E.M.; Smidt, G.; Prasad, M.; Tiilikkala, K.; Sohi, S.; Gascó, G.; Steiner, C.; Glaser, B.** (2017). “Synergistic use of peat and charred material in growing media – an option to reduce the pressure on peatlands?”. *Journal of Environmental Engineering and Landscape Management*, 25: 160-174.

**Laird, D.A.; Fleming, P.; Davis, D.D.; Horton, R.; Wang, B.; Karlen, D.L.** (2010). “Impact of biochar amendments on the quality of a typical Midwestern agricultural soil”. *Geoderma*, 158: 4443-4449.

**Loffredo, E.; Parlavecchia, M.; Perri, G.; Gattullo, R.** (2019). “Comparative assessment of metribuzin sorption efficiency of biochar, hydrochar and vermicompost”. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*.

**Marra, R.; Vinale, F.; Cesarano, G.; Lombardi, N.; d'Errico, G.; Crasto, A.; Mazzei, P.; Piccolo, A.; Incerti, G.; L. Woo, S.; Scala, F.; Bonanomi G.** (2018). “Biochars from olive mill waste have contrasting effects on plants, fungi and phytoparasitic nematodes”. *PLoS ONE* 13: e0198728.

**Monteiro, W.; Cícero Célio de Figueiredo, F.; Rodrigues, Coser, T.; Teixeira Vale, A.; Schneider, B.G.** (2017). “Is sewage sludge biochar capable of replacing inorganic fertilizers for corn production? Evidence from a two-year field experiment”. *Arch. Agron. Soil Sci.*

**Paneque, M.; De la Rosa, J. M.; Franco-Navarro, J. D.; Colmenero-Flores, J. M.; Knicker, H.** (2016). “Effect of pyrolyzed material amendment on morphology, 48 productivity and water relations of sunflower plants under non-irrigation conditions”. *Catena*, 147, 2016. p. 280-287.

**Paneque, M.; De La Rosa, J.M.; Kern, J.; Reza, M.T.; Knicker, H.** (2017). “Hydrothermal carbonization and pyrolysis of sewage sludges: What happen to carbon and nitrogen?”. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 128: 314-323.

**Steiner, C.; Harttung, T.** (2014). “Biochar as growing media additive and peat substitute”. *Solid Earth Discuss*, 6: 1023-1035.

**Taskin, E.; Bran, M.T.; Altomare, C.; Loffredo, E.** (2019). “Biochar and hydrochar from waste biomass promote the growth and enzyme activity of soil-resident ligninolytic fungi”. *Heliyon*, 5: e02051.

**Vega-Gutiérrez, T.A.; López- Urquidez, G.A.; Allende-Molar, R.; Amarillas-Bueno, L.A.; Romero-Gómez, S.J.; López- Orona, C.A.** (2019). “Aggressiveness and molecular characterization of *Fusarium* spp. associated with foot rot and wilt in Tomato in Sinaloa, Mexico”. *3 Biotech*, 9: 276.

**Vengadaramana, A.; Jashothan, P.T.J.** (2012). “Effect of organic fertilizers on the water holding capacity of soil in different terrains of Jaffna peninsula in Sri Lanka”. *Journal of Natural Products and Plant Resource*, 2: 500-503.

**Xue, C.; Shen, Z.; Hao, Y.; Yu, S.; Li, Y.; Huang, W.; Chong, Y.; Ran, W.; Li, R.; Shen, Q.** (2019). “Fumigation coupled with bio-organic fertilizer for the suppression of



watermelon Fusarium wilt disease re-shapes the soil microbiome”. *Applied Soil Ecology*, 140: 49-56.

**Yogev, A.; Raviv, M.; Hadar, Y.; Cohen, R.; Katan, J.** (2006). “Plant waste-based composts suppressive to diseases caused by pathogenic *Fusarium Oxysporum*”. *European Journal of Plant Pathology*, 116: 267–278.